

Padrão clínico e laboratorial de sensibilização a fungos

Clinical and laboratory profile of sensitisation to moulds

Data de receção / Received in: 30/06/2008

Data de aceitação / Accepted for publication in: 28/03/2009

Rev Port Imunoalergologia 2009; 17 (3): 225-241

Alexandra Santos¹, Isabel Carrapatoso¹, Fernando Rodrigues², Luísa Geraldes¹, Carlos Loureiro¹, Celso Chieira¹

¹Serviço de Imunoalergologia / Immunology Department

²Laboratório de Imunologia / Immunology Laboratory

Hospitais da Universidade de Coimbra

Nota / Note: 2.º prémio SPAIC-UCB 2008 / SPAIC-UCB 2008 2nd prize

RESUMO

Objectivo: Caracterizar clinicamente um grupo de doentes sensibilizados a fungos; comparar os resultados de diferentes testes diagnósticos; e definir um padrão de reactividade a espécies fúngicas comuns numa população de doentes com alergia respiratória. **Métodos:** Entre os doentes que consecutivamente realizaram testes cutâneos (TC) com bateria de fungos entre 2001 e 2005 (n=304), seleccionaram-se vinte com maior reactividade cutânea a pelo menos um dos seguintes fungos: *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cladosporium herbarum* e *Penicillium chrysogenum*. Para todos os doentes, analisaram-se os processos clínicos e realizaram-se TC, doseamento de IgE específica (IgE) e *immunoblotting* (IB) aos cinco fungos mencionados. A concordância dos exames referidos foi avaliada através do coeficiente kappa (κ) de Cohen. **Resultados:** No grupo de 20 doentes, com idades compreendidas entre os 20 e os 60 anos, 90% apresentavam rinite (55% persistente (P) moderada-grave, 39% P ligeira e 6% intermitente ligeira), 80% asma (56% P moderada, 19% P ligeira e 25% intermitente), 35% sinusite, 5% polipose nasal e 35% conjuntivite. A maioria estava sensibilizada a mais do que um fungo e a outros aeroalergénios. Comparando os resultados dos exames realizados, observou-se uma concordância entre IgE e IB ($\kappa=0,240$; $p=0,009$), mas não entre TC e IgE ($\kappa=0,09$; $p=0,303$) ou TC e IB ($\kappa=0,036$; $p=0,719$). No estudo de IB, foram identificadas proteínas com diferentes pesos moleculares, alguns correspondendo a alergénios já descritos. **Conclusões:** Este estudo vem reforçar a discordância entre testes *in vivo* e *in vitro* na sensibilização a fungos. Mais estudos e melhores extractos alergénicos são necessários. Por enquanto, deve manter-se um elevado índice de suspeição, bem como uma combinação de exames complementares no diagnóstico de alergia a fungos.

Palavras-chave: Alergénios, alergia a fungos, asma, fungos, IgE específica, *immunoblotting*, rinite, sensibilização, testes cutâneos.

ABSTRACT

Objective: To characterise a group of patients sensitised to moulds; to compare different diagnostic test results; and to define a pattern of reactivity to common fungal species in a population of patients with allergic respiratory disease. **Methods:** Twenty patients with the greatest skin reactivity to at least one of the following moulds: *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cladosporium herbarum* and *Penicillium chrysogenum* were selected from consecutive patients ($n = 304$) who had undergone skin prick testing (SPT) to moulds in our Allergy Clinic over a 5-year period (2001-2005). The medical records of all patients were reviewed and SPT, serum specific IgE (IgE) and immunoblotting (IB) to the 5 moulds listed above were performed. The agreement between the tests was evaluated using Cohen's Kappa coefficient. **Results:** In this group of adult patients, aged 20-60 years old, 90% had rhinitis (55% moderate-severe persistent, 39% mild persistent and 6% mild intermittent); 80% had asthma (56% moderate persistent, 19% mild persistent and 25% intermittent); 35% had sinusitis; 5% nasal polyposis; and 35% conjunctivitis. The majority was sensitised to more than one mould and to other inhalant allergens. Comparing the results of the three tests performed, an agreement between IgE and IB ($\kappa = 0.240$; $p = 0.009$) was found, but not between SPT and IgE ($\kappa = 0.09$; $p = 0.303$) or SPT and IB ($\kappa = 0.036$; $p = 0.719$). In the immunoblotting assays, proteins with different molecular weights (MW) were identified, some of which correspond to mould allergens already described. **Conclusion:** This study reinforces the inconsistency between in vivo and in vitro tests for mould sensitisation. Further studies and better allergen extracts are needed. For the time being, a high index of suspicion and combined in vivo and in vitro tests for the diagnosis of allergy to moulds should be maintained.

Key-words: Allergens, asthma, fungal allergy, fungi, immunoblotting, moulds, rhinitis, sensitisation, skin tests, specific IgE.

INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos ubíquos, subsistindo em condições ambientais diversas, tanto no ambiente interior como no ambiente exterior¹. A exposição humana a fungos pode ocorrer por partículas fúngicas aerossolizadas² (praticamente constante ao longo do ano), por contacto com espécies saprofíticas (ex: *Candida* na flora vaginal) ou infecciosas (ex: dermatomycose a *Trichophyton*³) ou ainda por ingestão de micoproteínas.

Diferentes espécies fúngicas têm sido reconhecidas como causadoras de patologia em seres humanos por meio de infecção, alergia, toxicidade ou efeito irritativo⁴. Os fungos podem estar envolvidos numa grande diversidade de doenças alérgicas, através de diferentes mecanismos imunológicos: hipersensibilidade do tipo I (são exemplos: rini-

INTRODUCTION

Moulds are ubiquitous organisms that subsist in a wide spectrum of environmental conditions in both indoor and outdoor environments¹. Human exposure can occur via aerosolised fungal particles² (practically constant all year-round), by contact with saprophytic fungi (e.g., *Candida* in the vaginal flora) or infections (e.g., dermatomycosis to *Trichophyton*³ species), or by ingestion of mycoproteins.

Different fungal species are known to cause disease in humans via infection, allergy, toxicity or irritant effects⁴. Moulds can give rise to a wide range of allergic diseases through different immunological mechanisms: type I hypersensitivity (e.g., rhinitis, conjunctivitis, asthma, atopic eczema and, rarely, systemic reactions) and

te, conjuntivite, asma, eczema atópico e, raramente, reações sistémicas) e hipersensibilidade de outros tipos (por exemplo: micose broncopulmonar alérgica, sinusite alérgica fúngica e pneumonite de hipersensibilidade).

A prevalência de sensibilização a fungos é difícil de estabelecer e varia entre estudos epidemiológicos. No entanto, estudos em diversas regiões do Mundo indicam que a sensibilização a fungos é comum, particularmente em doentes asmáticos e em crianças. Num estudo europeu multicêntrico⁵, cerca de 3% dos doentes com alergia respiratória em Portugal e 20% em Espanha estavam sensibilizados a espécies de *Alternaria* ou *Cladosporium*. Num estudo ibérico⁶, 23% dos doentes com rinite alérgica estudados na região centro de Portugal estavam sensibilizados a *Alternaria alternata*. A sensibilização a fungos do ambiente exterior tem sido associada à presença, persistência e gravidade da asma⁷⁻⁹, nomeadamente a sensibilização a *Alternaria alternata*¹⁰, cuja elevada contagem de esporos tem sido associada a “asma epidémica”. Fungos do ambiente interior têm sido menos implicados na asma¹¹; no entanto, alguns estudos recentes mostraram que a presença de fungos no ambiente doméstico aumenta a hiperreactividade brônquica e que a sua remoção pode ser benéfica¹².

Efectivamente, certas espécies fúngicas contêm proteínas potencialmente alergénicas, capazes de sensibilizar e desencadear sintomas de alergia em indivíduos predispostos^{1,13}. Os fungos, tal como outros aeroalergénios, são capazes de produzir proteases, que facilitam a penetração dos alergénios na mucosa das vias aéreas, funcionando como adjuvantes no processo de sensibilização, não só a fungos, mas também a outros aeroalergénios coexistentes, e são ainda capazes de produzir substâncias imunomoduladoras¹⁴, que podem potenciar a resposta imunológica Th2.

Apesar de terem alergenicidade comprovada, a importância dos fungos na doença alérgica tende a ser subestimada na prática clínica, em parte porque o diagnóstico de alergia a fungos se reveste de algumas dificuldades¹⁵. Em primeiro lugar, os alergénios fúngicos não estão completamente caracterizados, e muitos dos extractos actualmente disponíveis para testes *in vivo* e *in vitro* não estão normalizados, fornecendo resul-

other types of hypersensitivity (e.g., allergic bronchopulmonary mycosis, allergic fungal sinusitis and hypersensitivity pneumonitis).

It is hard to establish the prevalence of sensitisation to moulds, which varies among epidemiological studies. However, studies in different parts of the world show that sensitisation to moulds is common, particularly in asthmatics and children. In a multicentre European study⁵, approximately 3% of patients with respiratory allergy in Portugal and 20% in Spain were sensitised to *Alternaria* or *Cladosporium* species. In an Iberian study⁶, 23% of patients with allergic rhinitis in a Portuguese midlands region were sensitised to *Alternaria alternata*. Sensitisation to outdoor environment moulds has been associated to asthma and its persistence and severity⁷⁻⁹. This is particularly true for sensitisation to *Alternaria alternata*¹⁰; high *Alternaria* spore counts have been associated to ‘asthma epidemics’. While indoor environment moulds have been less implicated in asthma¹¹, some recent studies have shown that moulds in the domestic environment increase bronchial hyperreactivity and that eradicating these moulds can be beneficial¹².

Some species of moulds contain potentially allergenic proteins capable of sensitising and triggering allergic symptoms in susceptible individuals^{1,13}. Moulds, like other inhalant allergens, can produce proteases that facilitate the penetration of allergens into the airway mucosa, working as adjuvants in the process of sensitisation to moulds and other co-existing inhalant allergens. They can also produce immunomodulating substances¹⁴, which can potentiate the Th2 immunological response.

Despite moulds’ proven allergenicity, their role in allergic disease tends to be underestimated in clinical practice, partly since diagnosing allergy to moulds is somewhat difficult¹⁵. Firstly, mould allergens are not fully characterised and many extracts currently available for *in vivo* and *in vitro* tests are not standardised, leading to inconsistent results¹⁶. As moulds are pleo-

tados inconsistentes¹⁶. Sendo organismos pleomórficos, pode haver diferenças entre alergénios presentes em diferentes formas dos organismos fúngicos (por exemplo, dos esporos e do micélio), que por vezes dependem das condições ambientais nas quais os fungos crescem, ou entre alergénios de diferentes estirpes da mesma espécie fúngica¹⁷. Métodos de purificação de proteínas e condições de armazenamento dos extractos podem também resultar em diferenças na qualidade dos alergénios entre extractos. Em segundo lugar, os fungos são organismos com vias metabólicas complexas, libertando enzimas (que podem inclusivamente contribuir para a degradação de proteínas contidas nos extractos alergénicos) e produtos tóxicos, que tornam os procedimentos de diagnóstico *in vivo*, nomeadamente provas de provocação específicas, difíceis de realizar e com risco imprevisível de reacções adversas. Em terceiro lugar, a relação entre exposição, sensibilização e doença alérgica, é menos clara para fungos do que para outros aeroalergénios. A história clínica é muitas vezes pobre na determinação do papel da exposição a fungos na exacerbação dos sintomas, sendo também difícil discriminar outros factores, como a exposição concomitante a ácaros do pó doméstico. Finalmente, uma vez conhecido o resultado do teste diagnóstico, a sua interpretação não é linear dada a frequente polisensibilização dos doentes e a reactividade cruzada entre fungos, cujo significado clínico é ainda desconhecido^{1,18}.

Os objectivos do presente estudo foram: 1) caracterizar clinicamente um grupo de doentes sensibilizados a fungos; 2) comparar os resultados de diferentes testes diagnósticos; e 3) definir um padrão de reactividade a espécies fúngicas comuns numa população de doentes com alergia respiratória.

MÉTODOS

Seleção de doentes e desenho do estudo

Analysaram-se os resultados dos testes cutâneos de alergia por picada (TCA) consecutivamente realizados no Serviço de Imunoalergologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra entre Janeiro de 2001 e Dezembro de 2005, e nos quais tinha

morphic organisms, there could be differences in the allergens found in the organisms' different forms (such as the spores and the mycelia, which sometimes depend on the environmental conditions in which moulds grow) or in the allergens of different strains of the same fungal species¹⁷. Protein purification methods and extract storage conditions could also lead to differences in the quality of allergen extracts. Secondly, moulds are organisms with complex metabolism that release enzymes (that may inclusively contribute to the degradation of the proteins contained in the allergen extracts) and toxic products. This makes *in vivo* diagnostic procedures, namely specific challenge tests, hard to perform and also carries an unpredictable risk of adverse reactions. Thirdly, the relationship between exposure, sensitisation and allergic disease is less clear for moulds than for other inhalant allergens. The clinical history is often unhelpful in determining the role exposure to moulds played in exacerbating symptoms. It is also hard to discriminate other factors, such as concomitant exposure to house-dust-mites. Finally, once the result of the diagnostic test is known, its interpretation is not straightforward in view of patients' frequent polysensitisation and moulds' cross-reactivity, the clinical significance of which still remains unknown^{1,18}.

Our aims in this study were: 1) to clinically characterise a group of patients sensitised to moulds; 2) to compare different diagnostic test results; and 3) to define a pattern of reactivity to common fungal species in a population of patients with allergic respiratory disease.

METHODS

Patient selection and study design

We analysed the results of skin prick tests (SPT) to moulds consecutively performed at our Immunoallergo-

sido utilizada uma bateria de extractos fúngicos (n= 304 doentes). Seleccionaram-se os doentes com testes cutâneos positivos a pelo menos um dos seguintes fungos (n=129): *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cladosporium herbarum* e *Penicillium chrysogenum* (anteriormente designado *Penicillium notatum*). De entre estes, seleccionaram-se os doentes com maior reactividade cutânea a pelo menos um dos referidos fungos (n=40), isto é, com um diâmetro de pápula acima da média dos diâmetros na população de doentes considerada (4 mm)¹⁹. Foram analisados os processos clínicos dos doentes para recolha de dados demográficos (sexo e idade) e clínicos (presença e gravidade da doença alérgica e investigação diagnóstica prévia, incluindo testes cutâneos de alergia por picada). Este grupo seleccionado de doentes foi convidado a participar no estudo, tendo 20 doentes aceite o convite.

Todos os participantes responderam a um questionário padronizado sobre a(s) sua(s) doença(s) alérgica(s) – predominantemente asma e rinite –, a sua persistência, gravidade e factores precipitantes, bem como a sazonalidade dos sintomas, medidas de evicção alérgica adoptadas, tratamento em curso e seu efeito sobre os sintomas alérgicos. Seguidamente, independentemente do resultado dos TCA anteriores, os doentes foram submetidos a TCA aos cinco fungos referidos e a colheita de sangue para determinação de IgE específica sérica (IgE) e *immunoblotting* (IB) às mesmas espécies fúngicas. Foi obtido consentimento informado previamente à inclusão dos doentes no estudo.

Testes cutâneos de alergia por picada

Os TCA foram realizados utilizando um procedimento normalizado na face anterior do antebraço do lado não dominante do doente, utilizando extractos comerciais Bial Aristegui® das seguintes espécies fúngicas: *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cladosporium herbarum* e *Penicillium chrysogenum*. Uma solução salina a 0,9% foi utilizada como controlo negativo e uma solução de histamina com concentração de 10 mg/ml foi utilizada como controlo positivo. Os resultados foram avaliados 15 minutos depois, medindo a pápula resultante como a média de dois

logy Department, between January 2001 and December 2005, using a panel of fungal extracts (n = 304 patients). We selected patients with positive tests to at least one of the following moulds (n = 129 patients): *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cladosporium herbarum* and *Penicillium chrysogenum* (formerly known as *Penicillium notatum*). Of these, we selected patients with the greatest cutaneous reaction to at least one of the moulds listed above (n = 40), i.e. with wheal diameter larger than the population's mean (4 mm)¹⁹. We analysed the patients' records to collect demographic (gender and age) and clinical data (any allergic disease and its severity, prior diagnostic work-up including SPT). The 40 selected patients were invited to take part in the study and 20 accepted.

All patients answered a standard questionnaire on any allergic disease(s) –mainly asthma and rhinitis–, its persistence, severity and triggers, if symptoms were seasonal, avoidance measures practiced, treatment and its effect on the allergic symptoms. Next, irrespective of the results of prior SPTs, patients underwent SPT to the 5 moulds listed and had a blood sample taken for serum specific IgE (IgE) and immunoblotting (IB) to the same fungal species. Patients' informed consent was obtained prior to inclusion in the study.

Skin prick tests to moulds

The SPTs were performed in the usual way on patients' non-dominant inner forearm using Bial Aristegui® commercial extracts to *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cladosporium herbarum* and *Penicillium chrysogenum*. A 0.9% saline solution was used as negative control and a 10 mg/ml histamine solution as positive control. Results were assessed after 15 minutes by measuring the resulting wheal as the mean of 2 orthogonal diameters including that of the largest. A wheal diameter equal to or larger than 3 mm relative to the negative control was a positive result both in the SPT performed during the study and in interpreting the earlier SPTs.

diâmetros ortogonais, incluindo o de maiores dimensões. Um diâmetro de pápula maior ou igual a 3 mm relativamente ao controlo negativo foi considerado um resultado positivo, tanto nos TCA realizados durante o estudo como na interpretação dos registos de TCA realizados anteriormente.

IgE específica e immunoblotting

O doseamento de IgE específica sérica às cinco espécies fúngicas seleccionadas foi realizado utilizando o sistema ImmunoCAP® seguindo as instruções do fabricante (Phadia). Para efeitos de análise estatística, o valor de IgE específica foi considerado positivo quando maior ou igual a 0,35 KU/l.

A detecção de IgE específica às mesmas espécies fúngicas por *immunoblotting* foi realizada recorrendo a material, equipamento e instruções da DPC-Amerlab/Siemens Diagnostics®. Para efeitos de análise estatística, foram considerados resultados positivos aqueles em que pelo menos uma banda de ligação a IgE específica foi identificada.

Análise estatística

Foram analisados os resultados obtidos nos diferentes exames diagnósticos (TCA, IGE e IB) para os cinco fungos e em todos os doentes. O coeficiente kappa (κ) de Cohen foi utilizado como medida de avaliação da concordância dos resultados dos três exames, segundo os critérios de positividade expostos. Valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

RESULTADOS

População estudada

Cento e vinte e nove doentes, com idades compreendidas entre 15 e 60 anos, apresentaram TCA positivos a pelo menos uma espécie fúngica na bateria de fungos do nosso centro, no período de tempo considerado. As espécies fúngicas mais frequentemente implicadas foram: *Aspergillus fumigatus* (46%), *Aspergillus niger* (36%), *Alternaria tenuis* (34%), *Cladosporium herbarum* (38%), *Penicillium ro-*

Serum specific IgE and immunoblotting

Specific IgE to the 5 moulds in question was performed using the ImmunoCAP® system in line with the manufacturer's instructions (Phadia). For statistical analysis, IgE was considered positive when equal to or greater than 0.35 KU/l.

Immunoblotting (IB) to the same 5 moulds was performed using the DPC-Amerlab/Siemens Diagnostics® material, equipment and instructions. For statistical analysis, results in which at least one specific IgE binding band was identified were considered positive.

Statistical analysis

We analysed the results gleaned in the SPT, IgE and IB tests to the 5 moulds in all patients. The agreement of the three tests was evaluated using Cohen's Kappa coefficient, in line with the positive criteria above. *p* values below 0.05 were considered significant.

RESULTS

Study population

One hundred and twenty nine patients aged between 15 and 60 years old had positive SPT to at least one mould during the time period in question. The moulds most frequently implicated were: *Aspergillus fumigatus* (46%), *Aspergillus niger* (36%), *Alternaria tenuis* (34%), *Cladosporium herbarum* (38%), *Penicillium roqueforti* (32%), *Fusarium moniliforme* (31%), *Curvularia spicifera* (29%), *Candida albicans* (28%) and *Rhizopus nigricans* (26%), with the majority of patients polysensitised.

The mean age of the patients in our study group was 37 years (standard deviation 12, range 20-60 years) and 75% were female (Table 1). Ninety percent of patients had rhinitis (55% moderate-severe persistent, 39% mild persistent and 6% mild intermittent), 80% had asthma (56% moderate persistent, 19% mild persistent and 25% intermittent), 35% had conjunctivitis, 35%

queforti (32%), *Fusarium moniliforme* (31%), *Curvularia spicifera* (29%), *Candida albicans* (28%) e *Rhizopus nigricans* (26%), estando a maioria dos doentes polissensibilizada.

No grupo de 20 doentes incluído no estudo (Quadro 1), com idades compreendidas entre os 20 e os 60 anos (média de 37 anos, com desvio-padrão de 12 anos), 75% eram do sexo feminino. Noventa por cento dos doentes tinham rinite (55% persistente moderada-grave, 39% persistente ligeira e 6% intermitente ligeira), 80% tinham asma (56% persistente moderada, 19% persistente ligeira e 25% intermitente), 35% dos doentes tinham conjuntivite, 35% sinusite crónica, 5% polipose nasal e 5% onicomiose recorrente. Quinze por cento dos doentes referiram agravamento dos sintomas exclusivamente no ambiente exterior, 30% exclusivamente no ambiente interior e 25% em ambos (30% não responderam). Apenas seis doentes (30%) identificaram a presença de fungos visíveis no interior das habitações como factor de agravamento dos sintomas de asma e/ou rinite. Estes seis doentes não diferiram dos restantes catorze relativamente a características demográficas (sexo e idade) e clínicas (tempo de evolução da doença alérgica, proporção de doentes com asma e com rinite, gravidade da doença) por análise estatística utilizando o teste U de Mann-Whitney e o teste exacto de Fischer, conforme apropriado (dados não apresentados).

Em TCA anteriormente realizados, 19 (95%) dos participantes estavam polissensibilizados (89% estavam sensibilizados a ácaros do pó doméstico, 63% a pólenes, 37% a fâneros de animais e 18% a barata) e um doente (5%) estava monossensibilizado a *Aspergillus fumigatus*. Considerando a bateria de fungos utilizada no presente estudo, 15% dos participantes estavam sensibilizados a apenas um fungo (dois a *Aspergillus fumigatus* e um a *Alternaria alternata*), 50% estavam sensibilizados a dois fungos – as combinações mais frequentes sendo *Alternaria/Aspergillus* (4) e *Aspergillus/Cladosporium* (2) – e 35% estavam sensibilizados a três ou mais fungos.

O grupo de participantes no estudo (n=20) não diferiu significativamente do grupo inicialmente seleccionado (n=40) para participar no estudo, em relação às características demográficas e clínicas (dados não apresentados).

chronic sinusitis, 5% nasal polyposis and 5% recurrent onychomycosis. Fifteen per cent of patients complained that symptoms worsened only in outdoor environments, 30% only in indoor environments and 25% in both. Thirty per cent did not reply. Only 6 patients (30%) identified the presence of visible moulds inside their dwellings as a factor that exacerbated asthma and/or rhinitis symptoms. There were no differences between these 6 patients and the remaining 14 in demographic (gender and age) and clinical (length of allergic disease, proportion of patients with asthma and rhinitis, severity of disease) characteristics when analysed using the Mann-Whitney U and the Fisher exact test, as appropriate (data not shown).

Prior SPTs showed that 19 (95%) participants were polysensitised (89% were sensitised to house-dust-mites, 63% to pollen, 37% to animal dander and 18% to cockroach) and 1 (5%) was monosensitised to *Aspergillus fumigatus*. In terms of the panel of moulds' extracts used in our study, 15% of the participants were sensitised to only one mould (2 to *Aspergillus fumigatus* and 1 to *Alternaria alternata*). Fifty per cent were sensitised to 2 moulds, the most frequent combinations being *Alternaria/Aspergillus* (4 patients) and *Aspergillus/Cladosporium* (2 patients) and 35% were sensitised to 3 or more moulds.

The study group (n = 20) did not differ significantly from the group initially selected (n = 40) to take part in the study in terms of demographic and clinical data (data not shown).

Comparison of the SPT, IgE and IB results

Table 2 shows the proportion of positive results in each diagnostic test. We found a statistically significant agreement between IgE and IB ($\kappa = 0.240$; $p = 0.009$) and a lack of agreement between SPT and IgE ($\kappa = 0.09$; $p = 0.303$) and between SPT and IB ($\kappa = -0.036$; $p = 0.719$). Similar data were gleaned in analysing the results in the subgroup that identified exposure to moulds as triggering symptoms (data not shown).

Quadro I. Dados demográficos, clínicos e laboratoriais da população estudada. Nos resultados do IB, estão sublinhados os pesos moleculares de proteínas identificadas que podem corresponder a alergénios fúngicos conhecidos

Table I. Demographic, clinical and laboratory data of the study population. In the IB results, the molecular weights of the proteins identified that could correspond to known mould allergens are highlighted

Doentes Patients	Sexo / idade Gender / age	Doença alérgica Allergic disease	TCA / SPT (mm)					IgE (KU/L)					IB (KDa)				
			Aa	Af	Ca	Ch	Pc	Aa	Af	Ca	Ch	Pc	Aa	Af	Ca	Ch	Pc
1	F / 38	R/A/CS	0	6	0	0	0	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	17.90	–	51.53	–	–
2	F / 28	R/A/C/M	4	5	0	5	4	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	53.22	–	50.73	–	–
3	F / 27	R/CS/NP	0	7	0	4	3	0.9	23.4	1.8	0.6	2.6	53.22 64.33 116.30	29.96 34.43 38.93 44.02 59.60 61.58 63.63 67.94 90.49 99.02 106.59 111.95 119.53 140.80 145.49	–	17.84 38.20 43.55 46.12 56.13 126.26	50.46 71.76
4	M / 34	R/A/C	6	0	6	5	0	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	51.16	–	51.13	–	–
5	F / 20	R/A/C	9	0	5	0	0	21.6	<0.35	0.7	<0.35	<0.35	15.65 54.07	–	31.84 49.15 81.47	–	–
6	F / 44	R/C/CS	0	5	4	9	0	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	51.18	37.07	17.33	–	31.64 37.27
7	M / 59	R	4	5	0	0	0	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	52.80	–	115.31	–	29.40
8	M / 55	R/A/C/CS	5	3	0	0	0	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	53.22 58.51	–	–	46.12	35.49
9	F / 50	A	0	7	0	7	0	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	–	–	51.13	–	34.34
10	F / 60	R/A/CS	4	0	5	0	0	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	51.98	–	–	48.05	–
11	F / 43	R/A	8	7	0	0	0	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	–	–	49.93	51.72	–
12	F / 22	R/A	0	3	0	4	0	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	1.7	–	–	–	31.39 49.24	30.38 35.49
13	M / 50	A	4	5	3	0	0	0.4	0.9	0.4	0.8	2	54.07 61.35 65.35 74.74	32.25 37.07 42.95	–	–	13.07 31.90 37.27 48.44 50.46 70.02 110.76 130.46
14	M / 37	R/A/C/CS	10	0	0	0	0	6.5	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	15.53	120.52	101.62	–	–
15	F / 26	R/A/C	0	0	0	4	10	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	51.98	–	–	–	–
16	F / 32	R/A/CS	4	3	3	5	3	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	8.46 14.35 53.22	–	–	–	–
17	F / 36	R/A	0	0	5	0	4	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	–	–	51.53	–	–
18	F / 30	R	4	3	0	0	5	3.7	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	–	–	–	–	–
19	F / 23	R	0	5	0	3	0	4.6	0.6	2.1	1.4	0.8	53.22	–	–	35.20	–
20	F / 33	R	0	3	0	0	0	<0.35	1.2	4.2	<0.35	<0.35	24.75 52.39	35	18.76 26.76 42.64 46.14 49.93 62.29 73.52 84.08	–	30.88 36.37

A – asma / asthma; **R** – rinite / rhinitis; **C** – conjuntivite / conjunctivitis; **CS** – sinusite crónica / chronic sinusitis; **NP** – polipose nasal / nasal polyposis; **M** – micose / mycosis; **TCA / SPT** – testes cutâneos de alergia / skin prick tests; **Aa** – *Alternaria alternata*; **Af** – *Aspergillus fumigatus*; **Ca** – *Candida albicans*; **Ch** – *Cladosporium herbarum*; **Pc** – *Penicillium chrysogenum*.

Comparação dos resultados de TCA, IgE e IB

O Quadro 2 apresenta a proporção de resultados positivos em cada exame diagnóstico. Observou-se uma concordância estatisticamente significativa entre IgE e IB ($\kappa=0,240$; $p=0,009$) e uma ausência de concordância entre TCA e IgE ($\kappa=0,09$; $p=0,303$) e entre TCA e IB ($\kappa=-0,036$; $p=0,719$). Dados semelhantes foram obtidos na análise dos resultados obtidos no subgrupo que identificou a exposição a fungos como desencadeante dos sintomas (dados não apresentados).

Alergénios fúngicos e padrões de sensibilização

Utilizando a técnica de IB para os cinco fungos seleccionados, observou-se que proteínas com diferentes pesos moleculares (PM) foram reconhecidas pelas IgE específicas dos doentes (Quadro 1), algumas possivelmente correspondendo a alergénios fúngicos já identificados²⁰ (Quadro 3).

Com base nos resultados dos TCA, em função do número de sensibilizações às cinco espécies de fungos seleccionadas, estabeleceram-se três grupos de doentes: mono, bi ou polissensibilizados. Os resultados do IB para cada um desses grupos de doentes são apresentados de seguida.

No grupo de doentes sensibilizados apenas a uma espécie fúngica ($n=3$), a IgE sérica do doente monossensibilizado a *Alternaria alternata* reconheceu uma proteína de aproximadamente 15,3 KDa, que poderá corresponder ao alergénio major *Alt a 1*²⁰. Entre os dois doentes monossen-

Fungal allergens and sensitivity patterns

Using the IB to the 5 moulds in question, we found that proteins with different molecular weights (MW) were recognised by patients' serum specific IgE (Table 1), some possibly corresponding to fungal allergens already identified²⁰ (Table 3).

We established 3 patient groups (mono, bi or polysensitised) depending on number of SPT sensitisations to the 5 moulds tested. The IB results for each of these patient groups are shown below.

In the monosensitised group ($n = 3$), the IgE of the patient sensitised to *Alternaria alternata* recognised a protein of approximately 15.3 KDa, which could correspond to the major allergen *Alt a 1*²⁰. One of the two patients monosensitised to *Aspergillus fumigatus* did not recognise any protein in the extract of this mould and the other recognised a protein of approximately 34 KDa, which, in turn, could correspond to four different *Aspergillus fumigatus* allergens²⁰ (Table 3).

Among patients sensitised to two mould species ($n = 10$), of those sensitised to *Alternaria alternata*, one did not recognise any protein in the *Alternaria alternata* extract and the remaining four recognised a protein of approximately 53 KDa. One also recognised a protein which could correspond to *Alt a 1* and one other a protein of approximately 57 KDa. Sera of patients sensitised to *Aspergillus fumigatus* did not recognise any protein in the

Quadro 2. Proporção de resultados positivos nos TCA, IgE e IB aos cinco fungos estudados ($n=20$)

Table 2. Proportion of SPT, IgE and IB tests positive to the 5 moulds studied ($n=20$)

Extractos alergénicos / Allergen extracts	TCA / SPT	IgE	IB
<i>Alternaria alternata</i>	50 %	30 %	75 %
<i>Aspergillus fumigatus</i>	75 %	20 %	25 %
<i>Candida albicans</i>	35 %	25 %	55 %
<i>Cladosporium herbarum</i>	45 %	15 %	25 %
<i>Penicillium chrysogenum</i>	30 %	20 %	40 %

Quadro 3. Bandas (designadas pelo PM das proteínas) identificadas no IB, possíveis alérgenos correspondentes²⁰, sua função e proporção de doentes cujo soro reconheceu proteínas com peso molecular aproximado

Table 3. Bands (designated by the protein MW) identified in the IB, corresponding to possible allergens²⁰, their function and proportion of patients whose serum recognised proteins of approximate molecular weight

Espécies fúngicas Fungal species	PM aproximado Approximate MW (KDa)	Alergénios possíveis Possible allergens	Função da proteína / Protein function	% doentes % patients
<i>Alternaria alternata</i>	53	Alt a 10	Aldeído desidrogenase / Aldehyde dehydrogenase	65
	15	Alt a 1	Major / Major	20
	57	Alt a 4	Dissulfeto isomerase / Disulfide isomerase	5
	22	Alt a 7	Flavodoxina / Flavodoxin	5
<i>Aspergillus fumigatus</i>	34	Asp f 9	– / –	15
		Asp f 10	Protease aspártica / Aspartyl proteinase	
		Asp f 13	Serina protease alcalina / Alkaline serine proteinase	
		Asp f 18	Serina protease vacuolar / Vacuolar serine proteinase	
	37	Asp f 2	Proteína ligante de fibrinogénio / Fibrinogen binding protein	15
	30	Asp f 4	– / –	5
<i>Candida albicans</i>	44	Asp f 23	Proteína ribossómica L3 / Ribosomal protein L3	5
	43	Asp f 16	– / –	5
	90	Asp f 12	HSP90 / HSP90	5
	20	Can a CyP	Ciclofilina / Cyclophilin	10
<i>Cladosporium herbarum</i>	29	Can a 3	Proteína membrana peroxissómica / Peroxisomal membrane protein	10
	40	Can a 1	Álcool desidrogenase / Alcohol dehydrogenase	5
<i>Penicillium chrysogenum</i>	46	Cla h 6	Enolase / Enolase	25
	53	Cla h 10	Aldeído desidrogenase / Aldehyde dehydrogenase	10
<i>Penicillium chrysogenum</i>	34	Pen ch 13	Serina protease alcalina / Alkaline serine proteinase	30
	32	Pen ch 18	Serina protease vacuolar / Vacuolar serine proteinase	25
	68	Pen ch 20	N-acetil glucosaminidase / N-acetyl glucosaminidase	10

PM / MW – peso molecular / molecular weight.

sibilizados a *Aspergillus fumigatus*, um não reconheceu qualquer proteína no extracto deste fungo e o outro reconheceu uma proteína de aproximadamente 34 KDa de PM, que, por sua vez, poderia corresponder a quatro diferentes alérgenos de *Aspergillus fumigatus*²⁰ (Quadro 3).

Entre os doentes sensibilizados a duas espécies fúngicas (n=10), considerando aqueles sensibilizados a *Alternaria alternata*, um não reconheceu qualquer proteína no extracto de *Alternaria alternata* e os restantes quatro reconheceram uma proteína de cerca de 53 KDa de PM. Um deles reconheceu ainda uma proteína que poderia corresponder a *Alt a 1* e outro uma proteína de aproximadamen-

extract of this mould. Of the three patients sensitised to *Candida*, only one patient's serum recognised a protein with 29 KDa, similar to a recognised *Candida* allergen²⁰. This patient identified a further two proteins. A second patient identified a protein other than these and the third did not identify any protein in the IB to *Candida*. Of the patient group with SPT positive to *Cladosporium herbarum*, only one patient recognised proteins with MW similar to those of allergens already identified, one protein of 22 KDa and another of 46 KDa. A second patient in this group recognised a different protein and the other patient none. Finally, none of the patients sensitised to

te 57 KDa de PM. Considerando os doentes sensibilizados a *Aspergillus fumigatus*, nenhum dos soros dos doentes reconheceu qualquer proteína no extracto deste fungo. Entre os três doentes sensibilizados a *Candida*, apenas o soro de um doente reconheceu uma proteína com peso molecular semelhante ao de um alérgénio de *Candida* conhecido, com 29 KDa de PM²⁰. Este doente identificou ainda duas outras proteínas. Um segundo doente identificou uma proteína diferente destas e o terceiro não identificou qualquer proteína no IB a *Candida*. Considerando o grupo de doentes com TCA positivos a *Cladosporium herbarum*, apenas um doente reconheceu proteínas com PM semelhante ao de alérgénios identificados, uma proteína de 22 KDa e outra de 46 KDa. Um segundo doente reconheceu uma proteína diferente destas e outro doente nenhuma. Finalmente, nenhum dos doentes sensibilizados a *Penicillium chrysogenum* reconheceu qualquer proteína no extracto deste fungo.

Considerando o grupo de doentes polissensibilizados a fungos (n=7), isto é, sensibilizados a mais do que dois fungos nos TCA, observou-se que, no IB a *Alternaria alternata*, um doente não reconheceu qualquer proteína, e todos os outros reconheceram uma proteína de cerca de 53 KDa. Um deles identificou ainda uma proteína de aproximadamente 11 KDa e outra de 15.3 KDa. No mesmo grupo, cerca de metade dos doentes sensibilizados a *Aspergillus fumigatus* (6 doentes) identificaram proteínas no IB: todos reconheceram uma proteína de aproximadamente 37 KDa, um doente reconheceu uma de 34 KDa e outra de 43 KDa; outro doente reconheceu ainda proteínas de 30 KDa, 34 KDa, 44 KDa e 90 KDa, que podem corresponder a alérgénios fúngicos²⁰. Entre os quatro doentes polissensibilizados com TCA positivos a *Candida*, apenas um reconheceu uma proteína com PM semelhante ao de um alérgénio da *Candida albicans* identificado como tendo 20 KDa de peso molecular²⁰. Entre os doentes sensibilizados a *Cladosporium* e *Penicillium*, apenas um doente reconheceu possíveis alérgénios no IB: três proteínas de PM de 45, 46 e 53 KDa e uma proteína de 68 KDa de PM, respectivamente²⁰.

Penicillium chrysogenum reconheceu qualquer proteína no extracto deste fungo.

Considering patients polysensitised to moulds (n = 7), that is, sensitised to more than 2 moulds on SPT, one patient did not recognise any protein in the IB to *Alternaria alternata* and all the others recognised a protein of around 53 KDa. One of these patients further identified a protein of approximately 11 KDa and another of 15.3 KDa. In the same group, around half the patients sensitised to *Aspergillus fumigatus* (six) identified proteins in the IB: all recognised a protein of approximately 37 KDa; one patient recognised one of 34 KDa and another of 43 KDa; a further patient recognised still more proteins of 30 KDa, 34 KDa, 44 KDa and 90 KDa, which could correspond to mould allergens²⁰. Only one of the four patients polysensitised with positive SPT to *Candida* recognised a protein of 20 KDa, similar to a *Candida albicans* allergen already identified²⁰. Only one of the patients polysensitised to *Cladosporium* and *Penicillium* recognised possible allergens in the IB: 3 proteins of 45, 46 and 53 KDa MW and 1 protein of 68 KDa MW, respectively²⁰.

DISCUSSION

Our study presents a clinical and laboratory characterisation of a population of patients with allergic respiratory disease, in whom SPT showed sensitisation to moulds. We feel the study population reflects patients where one considers the possibility of mould allergy with all the difficulties inherent to its diagnosis.

The majority of patients had allergic rhinitis (90%) and asthma (80%), more frequently moderate-severe persistent allergic rhinitis (55%) and moderate persistent asthma (56%). These proportions were higher than those seen in the Iberian study already mentioned⁶, where the population with allergic rhinitis sensitised to *Alternaria alternata* studied in a Portuguese midlands region, presented mild

DISCUSSÃO

No presente estudo, caracterizámos do ponto de vista clínico e laboratorial uma população de doentes com patologia alérgica respiratória, sensibilizados a fungos em TCA. O grupo de doentes incluído no estudo parece-nos reflectir aqueles que encontramos na prática clínica, em que a alergia a fungos se equaciona e, com ela, todas as dificuldades inerentes ao seu diagnóstico.

A maioria dos doentes apresentava rinite alérgica (90%) e asma (80%), mais frequentemente rinite alérgica persistente moderada-grave (55%) e asma persistente moderada (56%). Estas proporções foram mais elevadas do que as observadas no estudo ibérico mencionado⁶, em que a população com rinite alérgica sensibilizada a *Alternaria alternata* estudada na região centro de Portugal apresentava rinite alérgica intermitente ligeira em 49%, intermitente moderada-grave em 1%, persistente ligeira em 25% e persistente moderada-grave em 25% dos casos, acompanhada por asma em 57% do total de casos.

A maior parte dos doentes forneceu uma história clínica pouco fiável relativamente ao papel da exposição a fungos como desencadeante dos sintomas respiratórios. É de facto frequente os doentes não se aperceberem da sua própria exposição a fungos, que geralmente é perianual, e não a identificarem como causa possível do agravamento dos sintomas respiratórios. No presente estudo, um terço dos doentes identificou a presença de fungos, nomeadamente a presença de fungos visíveis no interior das habitações, como factores de agravamento dos sintomas respiratórios, apesar de os fungos *indoor* serem os menos implicados na doença alérgica, de acordo com a literatura¹¹. Nenhum dos doentes reconheceu uma sazonalidade nos seus sintomas que pudesse ser relacionada com períodos de elevada contagem de esporos fúngicos na atmosfera. Como previamente exposto, este subgrupo apresentava características demográficas e clínicas sobreponíveis às dos restantes participantes no estudo.

A maioria dos doentes estava polissensibilizada a mais do que um fungo e a outros aeroalergénios. O mesmo foi ob-

intermittent allergic rhinitis in 49% of cases, moderate-severe intermittent in 1%, mild persistent in 25% and moderate-severe persistent in 25%, with concomitant asthma in 57% of all cases.

The majority of our patients gave a clinical history that did not greatly elucidate the role exposure to moulds played in triggering respiratory symptoms. Patients frequently do not understand their exposure to moulds, which is usually year-round and not identified as a possible cause of exacerbation of respiratory symptoms. In our study a third of patients identified the presence of moulds, namely those visible inside their dwellings, as factors that aggravated their symptoms, even though indoor moulds are less often implicated in allergic disease, according to the literature¹¹. No patient recognised a seasonal pattern to his/her symptoms, which could be connected to periods of high counts of airborne fungal spores. As stated above, this subgroup had similar demographic and clinical characteristics to the other study's participants.

The majority of patients were polysensitised to more than one mould and other inhalant allergens. The same was true in the Iberian study⁶ and seen by Mari *et al.* regarding allergy to fungi²¹ and pollens²². This contributes to the patients' difficulty in understanding moulds as triggers of allergic respiratory symptoms. Polysensitisation to moulds can be explained by co-sensitisation or cross-reactivity. In our group, co-sensitisation was probably the phenomenon in question, as the majority of patients were also sensitised to other inhalant allergens which were phylogenetically unrelated.

While the clinical significance of cross-reactivity between moulds is not known, in our patients the only two cases in which cross-reactivity would be possible, according to data suggested by the IB, would be in patients 13 and 20, both having identified a protein of 34 KDa in the IB to *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium chrysogenum*. These bands could correspond to alkaline serine proteinase, whose cross-reactivity was described by Shen *et al.*²³ in

servado no estudo ibérico⁶ e descrito por Mari *et al* relativamente à alergia a fungos²¹ e a pólenes²². Este facto contribui para a dificuldade dos doentes em reconhecer os fungos como desencadeantes dos sintomas alérgicos respiratórios. A polissensibilização a fungos pode ser explicada por fenómenos de cossensibilização ou reactividade cruzada. No nosso grupo de doentes, a cossensibilização é provavelmente o fenómeno em causa, uma vez que a maioria apresentava também sensibilização a outros aeroalergénios filogeneticamente não relacionados. Apesar de não se conhecer o significado clínico da reactividade cruzada entre fungos, neste grupo de doentes os únicos dois casos em que a reactividade cruzada seria possível, de acordo com dados sugeridos pelo IB, seriam os dos doentes 13 e 20, ambos identificando uma proteína de 34 KDa nos IB a *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium chrysogenum*. Estas bandas poderiam corresponder a proteases alcalinas séricas, cuja reactividade cruzada foi descrita por Shen *et al*²³ em espécies fúngicas dos mesmos géneros. É de salientar que um *clustering* de reactividade devido a cossensibilização e não a reactividade cruzada foi descrito por outros autores²⁴. De qualquer modo, para confirmar a reactividade cruzada entre estes fungos, ter-se-ia que proceder a estudos de inibição.

O painel de espécies fúngicas incluído no presente estudo foi seleccionado com base em dados da literatura e na prevalência de sensibilização a espécies de fungos na população portuguesa^{6,25}. No grupo inicial de doentes com TCA positivos a fungos, as principais espécies sensibilizantes foram *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus* e *Cladosporium herbarum*. Estas são as espécies fúngicas consideradas mais relevantes em estudos prévios, quer de natureza epidemiológica⁶, quer ambiental²⁶, quer clínica²⁷. O *Penicillium chrysogenum* é também considerado um fungo relevante^{5, 24}. Maior controvérsia rodeia o papel da *Candida albicans* na doença alérgica respiratória²⁸. Curiosamente, neste estudo, a *Candida albicans* foi o fungo com maior proporção de bandas reconhecida com peso molecular distinto dos alergénios descritos nesta espécie fúngica.

A comparação dos resultados dos TCA, IgE e IB, mostrou ausência de concordância entre testes *in vivo* e *in vitro*,

fungal species of the same genus. A clustering of reactivity due to co-sensitisation and not to cross-reactivity has been described by other authors²⁴. Inhibition assays would have been necessary to confirm cross-reactivity between these moulds.

The panel of fungal species included in our study was selected based on data in the literature and on the rate of sensitisation to moulds in the Portuguese population^{6,25}. In the initial group of patients with positive SPT to moulds, the main sensitising species were *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus* and *Cladosporium herbarum*. These are the mould species considered the most relevant in prior epidemiological⁶, environmental²⁶ and clinical²⁷ studies. *Penicillium chrysogenum* is also considered a relevant mould^{5,24}. Greater controversy surrounds the role played by *Candida albicans* in allergic respiratory disease²⁸. Interestingly, we found *Candida albicans* to be the mould with the higher proportion of bands recognised in the IB with different MW from the allergens already described for this fungal species.

Comparison of SPT, IgE and IB results showed lack of agreement in the *in vivo* and *in vitro* tests, in terms of SPT/IgE and SPT/IB. Only the IgE and IB tests showed agreement. However, the fact that the same extracts were not used in the *in vitro* studies and in SPT could have contributed to the discrepant results observed.

The proportion of patients with positive specific IgE was lower than the proportion with positive SPT, meaning that IgE seems less sensitive than SPT in diagnosing allergic sensitisation to moulds. This was seen by Mari *et al.*²¹ in patients sensitised to one or two fungi, even if this was not observed by this author in patients sensitised to more than two fungi. However, IB did not seem to add any information to that gleaned from the IgE assay, with the added disadvantage of being a costly and time-consuming technique.

The IB studies showed a great heterogeneity in band recognition patterns among patients, frequently not

isto é, TCA/IgE e TCA/IB. Apenas a IgE e os estudos de IB apresentaram resultados concordantes. No entanto, o facto de não terem sido utilizados os mesmos extractos nos estudos *in vitro* e nos TCA pode ter contribuído para a discordância dos resultados.

A proporção de doentes com IgE específica considerada positiva foi menor do que a de doentes com TCA positivos, isto é, a IgE parece ser menos sensível do que os TCA no diagnóstico de sensibilização alérgica a fungos. Isto vai ao encontro do observado por Mari *et al.*²¹ em doentes sensibilizados a um ou dois fungos, se bem que o mesmo não foi constatado por este autor em doentes sensibilizados a mais do que dois fungos. O IB, por seu lado, não pareceu acrescentar informação à obtida com a determinação de IgE específica, com a desvantagem adicional de ser uma técnica dispendiosa e morosa.

Nos estudos de IB, encontrámos uma grande heterogeneidade nos padrões de reconhecimento de bandas entre os doentes, frequentemente não correspondendo aos resultados dos TCA. Proteínas com pesos moleculares diferentes dos de alérgenos já identificados para estes fungos foram reconhecidas, e, entre os hipotéticos alérgenos, a maioria não correspondia a alérgenos *major*. Resultados semelhantes foram encontrados por Mari *et al.*²¹ em doentes polissensibilizados, cujo soro mostrou reactividade contra muitas proteínas nos extractos fúngicos, com número de componentes reconhecidos e intensidade de fixação imunológica variáveis. No entanto, os mesmos autores, em doentes monossensibilizados a *Alternaria alternata*, relataram uma predominância de reactividade a um componente de 14 KDa, provavelmente correspondendo a *Alt a 1*, um alérgeno *major*. Uma limitação do presente estudo pode ter sido a pequena quantidade de doentes monossensibilizados, resultado do próprio desenho do estudo, em quem a sensibilização a fungos poderia ser mais relevante.

Este estudo reflecte as limitações no diagnóstico de sensibilização e alergia a fungos. Estas limitações partem logo da história clínica, já que os doentes geralmente não reconhecem

correspondendo to SPT results. Proteins with different MW from the allergens already identified for these moulds were recognised and the majority of the possible allergens did not correspond to major allergens. Similar results were found by Mari *et al.*²¹ in polysensitised patients whose serum showed reactivity against many proteins in the fungal extracts, with variable number of recognised components and intensity of immunological fixation. The same authors, however, describe a predominant reactivity to a component of 14 KDa in patients monosensitised to *Alternaria alternata*, probably corresponding to *Alt a 1*, a major allergen. A limitation of our study could have been the small number of monosensitised patients, a result of the study design, in whom sensitisation to moulds could have been more significant.

This study reflects the limitations in diagnosing allergy to moulds. These stem from the clinical history, in that patients generally do not recognise moulds as possible triggers of allergic symptoms. More studies into environmental exposure to moulds and into mycology are needed for a better characterisation of the organisms and their allergens. In addition, the importance of allergen avoidance measures to moulds should be reassessed.

Despite efforts to improve mould allergen extracts²⁹ over the last few decades, the available preparations are not yet standardised, nor are they representative of patients' exposure and, thus, are not reliable for diagnosis⁵. Commercial extracts from different manufacturers give variable results⁵. We used the mould allergen extracts normally used in our Centre. The importance of moulds in respiratory allergy however demands allergenic extracts for diagnosis that are of the best quality, standardised, stable, well characterised and representative of patients' environmental exposure. As the allergenic extracts currently available are far from ideal and there is no correlation between *in vivo* and *in vitro* tests, both of these have to be balanced when the possibility of allergy to moulds is considered.

os fungos como potenciais factores desencadeantes dos sintomas alérgicos. São necessários mais estudos sobre a exposição ambiental a fungos e também na micologia, de maneira a obter uma melhor caracterização dos organismos e dos seus alergénios. Para além disso, a relevância das medidas de evicção alergénica no que respeita a fungos deve ser reavaliada.

Apesar dos esforços ao longo das últimas décadas para melhorar os extractos alergénicos fúngicos²⁹, as preparações disponíveis não são ainda normalizadas nem são representativas da exposição dos doentes, não sendo por isso fiáveis para o diagnóstico⁵. Extractos comerciais de diferentes fabricantes fornecem resultados variáveis⁵, tendo sido utilizados neste estudo os extractos alergénicos de fungos habitualmente utilizados no nosso centro. No entanto, a importância dos fungos na alergia respiratória exige extractos alergénicos para diagnóstico de melhor qualidade, normalizados, estáveis, bem caracterizados e representativos da exposição ambiental dos doentes. Actualmente, como os extractos alergénicos disponíveis estão longe do ideal e não há correlação entre os resultados de testes *in vivo* e *in vitro*, ambos têm que ser conjugados quando se considera a hipótese de alergia a fungos.

Recentemente, vários alergénios moleculares foram clonados a partir de espécies de *Alternaria*³⁰, *Aspergillus*³¹, *Cladosporium*^{30,32}, *Candida*²⁸ e *Penicillium*³³. A especificidade dos alergénios recombinantes nos TCA e testes serológicos é superior à obtida com os extractos comerciais actualmente disponíveis³⁴. A utilização de alergénios recombinantes na realização de testes de alergia na prática clínica poderia melhorar significativamente o diagnóstico de alergia a fungos. Os alergénios recombinantes são reprodutíveis, standardizados bioquímica e imunologicamente e passíveis de serem produzidos em grandes quantidades. Para além disso, poderiam ser úteis na definição de padrões de sensibilização e na distinção entre cossensibilização e reactividade cruzada quando utilizados em estudos de inibição. Em relação ao *Aspergillus fumigatus*, um padrão de reactividade a alergénios recombinantes específicos deste fungo tem sido relacionado com entidades nosológicas distintas. Hemmann *et al.*³⁵ e Kurup *et al.*³⁶ mostraram que diferentes alergénios recom-

Several molecular allergens have recently been cloned from species of *Alternaria*³⁰, *Aspergillus*³¹, *Cladosporium*^{30,32}, *Candida*²⁸ and *Penicillium*³³. The specificity of the recombinant allergens in the SPT and serum specific IgE assays is higher than that obtained using the commercial extracts currently available³⁴. Using recombinant allergens in allergy tests in clinical practice could significantly improve diagnosis of allergy to moulds. Recombinant allergens are reproducible, biochemically and immunologically standardised and can be produced in great quantities. Furthermore, they can be used to define sensitisation patterns and distinguish between co-sensitisation and cross-reactivity when used in inhibition assays. The reactivity pattern and specific recombinant allergens of *Aspergillus fumigatus* have been associated with clinically distinct entities. Hemmann *et al.*³⁵ and Kurup *et al.*³⁶ showed that different recombinant allergens can help in differentiating allergic bronchopulmonary aspergillosis (Asp f 2, Asp f 4 and Asp f 6) from IgE-mediated allergy to the same mould (Asp f 1 and Asp f 3).

In conclusion, studies to better understand the role moulds play in respiratory allergy are needed. We need to minutely characterise the fungal allergens implicated, characterise patient environmental exposure, establish a causal relationship between exposure and symptoms and obtain quality allergen extracts for both diagnosis and treatment. For the time being, allergists should maintain a high index of suspicion of allergy to moulds, namely in patients with respiratory allergy, and use both *in vivo* and *in vitro* tests, particularly SPT and serum specific IgE, for the diagnosis of allergy to moulds.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Helena Monteiro for technical laboratory assistance and Magda Madeira and Margarida Santos for their cooperation in this study.

binantes podem contribuir para diferenciar a aspergilose broncopulmonar alérgica (Asp f 2, Asp f 4 e Asp f 6) da alergia ao mesmo fungo mediada por IgE (Asp f 1 e Asp f 3).

Em suma, são necessários estudos para compreender melhor o papel dos fungos na alergia respiratória. É preciso caracterizar exaustivamente os alérgenos fúngicos implicados, caracterizar a exposição ambiental dos doentes, estabelecer uma relação de causalidade entre exposição e sintomas e obter extractos alérgenos de qualidade, tanto para o diagnóstico como para eventual tratamento. Por enquanto, os alergologistas devem manter um elevado índice de suspeição para a alergia a fungos, nomeadamente em doentes com alergia respiratória, e recorrer simultaneamente a testes *in vivo* e *in vitro*, nomeadamente TCA e doseamento de IgE específica sérica, para o diagnóstico de sensibilização alérgica a fungos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Helena Monteiro, pelo apoio técnico laboratorial, e a Magda Madeira e a Margarida Santos, pela colaboração no estudo.

APOIO FINANCEIRO

Este estudo foi parcialmente financiado pela DPC-Amerlab/Siemens Diagnostics®.

FINANCIAL DISCLOSURE

This study was partially supported by DPC-Amerlab/Siemens Diagnostics®.

Contacto / Contact:

Alexandra Santos
Serviço de Imunoalergologia
Hospitais da Universidade de Coimbra
Praceta Mota Pinto
3000-075 Coimbra, Portugal
Email: alexandrafigueirasantos@gmail.com

REFERÊNCIAS / REFERENCES

- Simon-Nobbe B, Denk U, Pol IV, Rid R, Breitenbach M. The spectrum of fungal allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 145:58-86.
- D'Amato G, Spieksma FT. Aerobiologic and clinical aspects of mould allergy in Europe. *Allergy* 1995; 50:870-7.
- Palma-Carlos AG, Palma-Carlos ML. Trichophyton allergy: review of 89 cases. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2006; 38:177-81.
- Bush RK, Portnoy JM, Saxon A, Terr AI, Wood RA. The medical effects of mold exposure. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:326-33.
- D'Amato G, Chatzigeorgiou G, Corsico R, Gioulekas D, Jager L, Jager S, et al. Evaluation of the prevalence of skin prick test positivity to *Alternaria* and *Cladosporium* in patients with suspected respiratory allergy. A European multicenter study promoted by the Subcommittee on Aerobiology and Environmental Aspects of Inhalant Allergens of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1997; 52:711-6.
- Pereira C, Valero A, Loureiro C, Davila I, Martinez-Cocera C, Murio C, et al. Iberian study of aeroallergens sensitisation in allergic rhinitis. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2006; 38:186-94.
- Portnoy JM, Barnes CS, Kennedy K. Importance of mold allergy in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2008; 8:71-8.
- Zureik M, Neukirch C, Leynaert B, Liard R, Bousquet J, Neukirch F. Sensitisation to airborne moulds and severity of asthma: cross sectional study from European Community respiratory health survey. *BMJ* 2002; 325:411-4.
- O'Driscoll BR, Hopkinson LC, Denning DW. Mold sensitization is common amongst patients with severe asthma requiring multiple hospital admissions. *BMC Pulm Med* 2005; 5:4.
- Pulimood TB, Corden JM, Bryden C, Sharples L, Nasser SM. Epidemic asthma and the role of the fungal mold *Alternaria alternata*. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:610-7.
- Portnoy JM, Kennedy K, Barnes CS. Controversies regarding dampness and mold growth in homes. *Allergy Asthma Proc* 2007; 28:257-8.
- Burr ML, Matthews IP, Arthur RA, Watson HL, Gregory CJ, Dunstan FD, et al. Effects on patients with asthma of eradicating visible indoor mould: a randomised controlled trial. *Thorax* 2007; 62:767-72.
- Bush RK, Portnoy JM. The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:S430-40.
- Lull C, Wichers HJ, Savelkoul HF. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators Inflamm* 2005; 2005:63-80.
- Frew AJ. Mold allergy: some progress made, more needed. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:216-8.
- Esch RE. Manufacturing and standardizing fungal allergen products. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:210-5.
- Steringer I, Aukrust L, Einarsson R. Variability of antigenicity/allergenicity in different strains of *Alternaria alternata*. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 84:190-7.
- Simon-Nobbe B, Probst G, Kajava AV, Oberkofler H, Susani M, Cramer R, et al. IgE-binding epitopes of enolases, a class of highly conserved fungal allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:887-95.
- Bodtger U, Poulsen LK, Malling HJ. Asymptomatic skin sensitization to birch predicts later development of birch pollen allergy in adults: a 3-year follow-up study. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:149-54.
- Duchaine J, Spapen R. The influence of moulds in respiratory allergy as evidenced by provocation tests. *Acta Allergol Suppl (Copenh)* 1960; 7:170-4.
- Mari A, Schneider P, Wally V, Breitenbach M, Simon-Nobbe B. Sensitization to fungi: epidemiology, comparative skin tests, and IgE reactivity of fungal extracts. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:1429-38.
- Mari A. Multiple pollen sensitization: a molecular approach to the diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125:57-65.
- Shen HD, Lin VL, Tam MF, Wang SR, Tsai JJ, Chou H, et al. Alkaline serine proteinase: a major allergen of *Aspergillus oryzae* and its cross-reactivity with *Penicillium citrinum*. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 116:29-35.
- Potter PC, Juritz J, Little F, McCaldin M, Dowdle EB. Clustering of fungal allergen-specific IgE antibody responses in allergic subjects. *Ann Allergy* 1991; 66:149-53.
- Chieira C, Loureiro AC, Paiva J, Todo-Bom A, Pereira AC, Faria E, et al. Fungos e alergia respiratória. *Via Pneumologica* 1990; 2:103-10.
- Nunes C, Câmara I, Almeida M, Gaspar A, Elsa C, Brandão R, et al. Fungi in the atmosphere of Portugal. *Allergy* 2008; 63(Suppl 88):56.
- Cruz L, Andrade R, Plácido J, Botelho C, Silva R, Sousa Cabral J, et al. Sensitisation to fungal extracts in Porto. *Allergy* 2008; 63(Suppl 88):57.
- Akiyama K, Shida T, Yasueda H, Mita H, Yanagihara Y, Hasegawa M, et al. Allergenicity of acid protease secreted by *Candida albicans*. *Allergy* 1996; 51:887-92.
- Savolainen J, Kalimo K, Einarsson R, Koivikko A, Viander M, Terho EO. In-house reference (IHR) preparation of *Candida albicans* allergen extract. A standardized extraction procedure. *Allergy* 1998; 53:359-66.
- Breitenbach M, Simon-Nobbe B. The allergens of *Cladosporium herbarum* and *Alternaria alternata*. *Chem Immunol* 2002; 81:48-72.
- Cramer R. Molecular cloning of *Aspergillus fumigatus* allergens and their role in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Chem Immunol* 2002; 81:73-93.
- Achatz G, Oberkofler H, Lechenauer E, Simon B, Unger A, Kandler D, et al. Molecular cloning of major and minor allergens of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum*. *Mol Immunol* 1995; 32:213-27.
- Chou H, Lai HY, Tam MF, Chou MY, Wang SR, Han SH, et al. cDNA cloning, biological and immunological characterization of the alkaline serine protease major allergen from *Penicillium chrysogenum*. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 127:15-26.
- Schmid-Grendelmeier P, Cramer R. Recombinant allergens for skin testing. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125:96-111.
- Hemmann S, Menz G, Ismail C, Blaser K, Cramer R. Skin test reactivity to 2 recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens in A fumigatus-sensitized asthmatic subjects allows diagnostic separation of allergic bronchopulmonary aspergillosis from fungal sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:601-7.
- Kurup VP, Banerjee B, Hemmann S, Greenberger PA, Blaser K, Cramer R. Selected recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens bind specifically to IgE in ABPA. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:988-93.